

Experimentelle Untersuchung der Expressionsinduktion
von pAkt während der Wundheilung in bestrahltem
Gewebe-radiogene Induktion von pAkt und dermale
Fibrose

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susanne Pinkert
geboren am 21. 02. 1983 in Zeitz

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze- Mosgau, Jena**
- 2. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena**
- 3. Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert, Regensburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.03.2009

Abkürzungsverzeichnis

TGF beta	Transforming Growth Factor beta
Akt	Proteinkinase B
EMT	Epithelial- Mesenchymale Transition
PI3K	Phosphatidyl- Inositol- 3- Kinase
PKC	Proteinkinase C
PK-1	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
SRC	proto- onkogene Kinasen- Familie
PTEN	Inositol- Phospholipid- Phosphatasen
MMP1	Matrix- Metallo- Proteinase 1
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor- Receptor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
MAPK	Mitogen- Activated- Protein- Kinase
ECM	Extra- Cellular Matrix
TBS	Tris- Buffered Saline (Standardpuffer)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1. <i>Klinischer Hintergrund</i>	7
2.2. <i>Kenntnisstand</i>	9
2.2.1. Bestrahlungsfolgen in Abhängigkeit von der Dosis	9
2.2.2. Epithelial- Mesenchymale Transition (EMT)	9
2.2.3. Der PI3Kinase /Akt –Signalweg	15
2.2.4. Vorkommen und Funktion von Akt	18
2.2.5. EMT, Wundheilung und Fibrose	20
3. Ziele der Arbeit- Fragestellung	23
4. Material und Methoden	24
4.1. <i>Tiermodell</i>	24
4.2. <i>Etablierung der Nachweismethode</i>	25
4.3. <i>Immunoblot- Analyse</i>	25
5. Ergebnisse	29
5.1. <i>Semiquantitative Immunoblot- Analyse</i>	29
5.1.1. Expression phospho- Akt	28
6. Diskussion	34
6.1. <i>Diskussion Tiermodell</i>	34
6.2. <i>Diskussion Methode</i>	34
6.3. <i>Diskussion Ergebnisse</i>	35
7. Schlussfolgerung	38
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	39
9. Anhang	47
- Danksagung	47
- Ehrenwörtliche Erklärung	48

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der multimodalen Tumorthherapie werden Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich präoperativ radiotherapeutisch behandelt. Das Risiko eines Lokalrezidivs wird verringert und der Anteil kurativ intendierter Resektionen erhöht. Die Rekonstruktion der strukturellen Defekte ist aufgrund des Auftretens von Wundheilungsstörungen problembehaftet. Durch Bestrahlung sind die Vaskularisation des Transplantatlagers verringert und die Kollagensynthese gesteigert. Die Gewebearchitektur verändert sich und die Regulation des Zytokinnetzwerkes wird durch die Radiotherapie ebenso beeinflusst wie intrazelluläre und intranukleäre Signaltransduktionswege. Hierbei sind die Vaskularisations- und Fibroserelevanten Zytokine von besonderem Interesse. Ein Schlüsselement ist TGFbeta, da es sowohl Wundheilung und Vaskularisation, wie auch Zell-Matrix- Interaktionen beeinflusst. Allerdings finden sich in der Signaltransduktion eine Reihe nachgeschalteter Mediatoren von TGFbeta, die auch TGFbeta- unabhängig aktiviert werden. Dazu gehört Akt. Als nachgeschalteter Effektor der PI3Kinase im Zytoplasma beeinflusst Akt Gewebedifferenzierung (EMT), Zellmotilität, Zellwachstum, Apoptose und Fibrose. Diese Vorgänge unterliegen dem Einfluss der Radiotherapie und werden durch diese beeinträchtigt. Zurzeit herrscht noch Unklarheit über das Ausmaß der TGFbeta- unabhängigen Akt- Aktivierung im Rahmen von TGFbeta- Modulationen. Ziel der Arbeit ist die vergleichende, semiquantitative Bestimmung von phosphoryliertem Akt in bestrahltem und unbestrahltem Gewebe. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob Akt im Einflussbereich einer Antagonisierung von TGFbeta, im Rahmen eines antifibrotischen Therapieansatzes, liegt.

Das zu Beginn der Dissertation bereits vorliegende Material wurde mit Hilfe des semiquantitativen Westernblots mit normalisierter Proteinratio untersucht. Damit ist die quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

Die unbestrahlten Proben vom 0. Tag zeigen keine Veränderung der p-Akt Expression, während die Expression von phospho- Akt in vorbestrahlten Proben signifikant erhöht ist. Eine unverändert hohe Expression ist auch am 3.

postoperativen Tag festzustellen. Die anti- TGFbeta Behandlung hat weder am 3. noch am 28. Untersuchungstag Einfluss auf die Expression von p-Akt.

Die Expression von p-Akt ist am 14. postoperativen Tag in den unbestrahlten Proben rückläufig und in den präoperativ bestrahlten Proben unverändert hoch. Im weiteren Verlauf bis zum 28. Tag kann kein Expressionsrückgang in den bestrahlten Proben verzeichnet werden.

Die bereits bekannte Radioinduzierbarkeit von p-Akt konnte anhand des eigenen Probenmaterials bewiesen werden. Die Antagonisierung von TGFbeta scheint keinen Einfluss auf die p- akt Expression zu haben. Damit ist die Möglichkeit der Fibrosereduktion durch anti-TGFbeta nicht suffizient, da die der Fibrose zugrunde liegende EMT durch Akt aufrechterhalten werden kann. Es ist bekannt das Fibrose auch TGFbeta- unabhängig möglich ist. Hier spielt Akt eine Rolle, da gezeigt wurde, dass es nicht durch Smad- Modulation beeinflussbar ist. Deshalb kann vermutet werden, dass Akt die Fibrosierung vorbestrahlter Wundareale, trotz Antagonisierung von TGFbeta, unterhält. Hinzu kommt die ohnehin erhöhte Expression von p- akt nach Bestrahlung.

TGFbeta ist ein zentraler Mediator der Kollagendeposition und ein Hauptakteur der Fibrose. Es existieren Beweise das PI3K/AKT zum einen TGFbeta nachgeschaltet aktiviert werden kann. Zum anderen wurde auch eine direkte Interaktion von TGFbeta-Rezeptorkomplex und PI3K gezeigt. Darüberhinaus hat eine Studie gezeigt das in Fibroblasten die PI3K-Aktivierung in Reaktion auf TGFbeta die Smad2/3- Phosphorylierung, nukleäre Translokation und Transkriptionsaktivität nicht beeinflusst. Durch die Untersuchungen von Bujor et al. 2008 wurde bestätigt, das in humanen dermalen Fibroblasten die Smad2/3- Aktivierung durch Inhibierung von Akt nicht beeinflusst wird. Obwohl in vorangegangenen Studien berichtet wurde, das PI3K in die TGfbeta-Regulation der Kollagen- Gen- Expression involviert ist, wurde in oben genannter Studie bewiesen, das die Blockade von Akt der TGFbeta- Kollagen- Induktion nicht vorbeugen konnte.

Mithilfe der Ergebnisse könnte ein neuer Therapieansatz zur Antifibrose im vorbestrahlten Gewebe entstehen. Möglicherweise ist die Inhibition von Akt effektiver als die Antagonisierung von TGFbeta.

2. Einleitung

2.1. Klinischer Hintergrund

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich werden im Rahmen der multimodalen Tumorthherapie präoperativ radiotherapeutisch behandelt. Diese Maßnahme verringert das Risiko eines Lokalrezidivs und erhöht den Anteil kurativ intendierter Resektionen. Um die entstandenen strukturellen Defekte funktionell und ästhetisch zu rehabilitieren, werden freie Hart- und Weichgewebetransplantate eingesetzt. Sie werden in defektfernen Spenderarealen gehoben und mikrochirurgisch an Anschlussgefäße im Resektionsbereich anastomosiert.

Ein Erfolg der rekonstruktiven Eingriffe ist jedoch problembehaftet, da im vorbestrahlten Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß Wundheilungsstörungen auftreten (Herskind et al. 1998, Langberg et al. 1994), die zum Einen der Bestrahlung selbst, als gewebescheidigenden Faktor, und zum Anderen der radioinduzierten Dysregulation des komplexen Zytokinnetzwerkes geschuldet sind. Es kommt vor, daß ein über den Gefäßstiel gut perfundiertes Transplantat im bestrahlten Transplantatlager unter dem Bild fibrotischer Veränderungen im Übergangsbereich verzögert oder gar nicht einheilt.

Durch Bestrahlung ist die Vaskularisation des Transplantatlagers verringert und die Kollagensynthese gesteigert.

Das Risiko des Transplantatverlustes ist im Vergleich zum Einsatz freier Transplantate im nicht vorstrahlten Lager erhöht (Aitasalo et al. 1997).



Abb.1: Patientin mit Plattenepithel-Karzinom des Mundbodens, Zustand nach ablativer Therapie mit mikrovaskulärem Gewebeersatz und perkutaner adjuvanter Radiatio (65 Gy); cervikale Wundheilungsstörung im Rahmen der ersten Folge-OP (Augmentation) mit erneuter protrahierter Wundheilung bei Folgeeingriff (Materialentfernung) als Zeichen der lokalen Gewebealteration im Sinne einer Strahlenfibrose Quelle: Fotoarchiv der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie der Universität Jena

Diesem klinischen Problem entsprechen auf biologischer Ebene die Abnahme der Gesamtzellzahl und die Erhöhung der Apoptoserate. Die Anzahl der Gefäße ist reduziert und der Kapillardurchmesser nimmt ab. Es ist eine Veränderung der Gewebezusammensetzung zu verzeichnen.

Epithelzell- und Endothelzelldegeneration sind weitere Folgen der Bestrahlung. Die Anzahl der Fibroblasten ändert sich kaum, sie gehen aber zur gesteigerten Kollagensynthese über.

Subzellulär sind die Zell- Matrix- Interaktion und die Regulation des Zytokinnetzwerkes durch die Radiotherapie ebenso beeinflusst wie intrazelluläre und intranukleäre Signaltransduktionswege.

Hierbei sind die Vaskularisations- und Fibroserelevanten Zytokine von besonderem Interesse. TGF beta kommt eine Schlüsselrolle zu, da es multifunktional an der Steuerung der Wundheilungsphasen beteiligt ist und sowohl Einfluss auf die Vaskularisation, als auch auf die Zell- Matrix- Interaktionen und somit auf die Gewebearchitektur hat.

Allerdings finden sich in der Signaltransduktion eine Reihe nachgeschalteter Mediatoren von TGFbeta, die auch TGFbeta- unabhängig aktiviert werden. Dazu gehört AKT. Als nachgeschalteter Effektor der PI3Kinase im Zytoplasma beeinflusst AKT viele wichtige Prozesse in der Zelle. So zum Beispiel die Regulierung von Gewebedifferenzierung(EMT), Zellmotilität, Zellwachstum, Apoptose und Fibrose. Diese Vorgänge unterliegen dem Einfluss der Radiotherapie und werden durch diese beeinträchtigt. Zurzeit herrscht noch Unklarheit über das Ausmaß der TGFbeta- unabhängigen Akt- Aktivierung im Rahmen von TGFbeta- Modulationen.

Zur Evaluierung antifibrotischer Therapieansätze zur Optimierung der Wundheilung im vorbestrahlten Lager ist die vergleichende, semiquantitative Betrachtung von aktiviertem AKT in bestrahlten und unbestrahlten Geweben notwendig.

2.2. Kenntnisstand

2.2.1. Bestrahlungsfolgen in Abhängigkeit von der Dosis

Beim Einsatz von Weichgewebstransplantaten im vorbestrahlten Gewebe im Rahmen der rekonstruktiven Tumorchirurgie treten in unterschiedlichem Ausmaß Wundheilungsstörungen auf (Bernstein et al. 1994, Peat et al. 1994, Wie et al. 1998). Das Risiko eines Transplantatverlustes ist im Vergleich zum Einsatz freier Transplantate im nicht vorbestrahlten Lager erhöht (Aitasalo et al. 1997).

Die Ursache für den frühzeitigen Transplantatverlust liegt in einem vermehrten Thromboserisiko begründet, bedingt durch Mediafibrosierung und Intimadegeneration in den vorbestrahlten Anschlußgefäßen (Aitasalo et al. 1994, Aitasalo et al. 1997). In der bestrahlten Gefäßwand ist die Anzahl glatter Gefäßmuskelzellen vermindert, die Kollagensynthese dagegen vermehrt

(Antonakopoulos et al. 1982, Illsley et al. 2000). In Untersuchungen am eigenen Patientengut im Rahmen mikrochirurgischen Gewebetransfers zur Rekonstruktion nach ablativer Tumorchirurgie konnte eine dosisabhängige Intimadegeneration und Mediahyalinisierung vorbestrahlter Gefäße gezeigt werden (Schultze- Mosgau et al. 2000).

2.2.2. Epithelial- Mesenchymale Transition (EMT)

Als Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Sie ist ein wichtiger Prozess während der Entwicklung und Onkogenese, während dessen Epithelzellen Fibroblasten- ähnliche Eigenschaften erlangen und reduzierte interzelluläre Adhäsion und gesteigerte Motilität zeigen.

Die Rolle der EMT für die Fibrogenese wurde aktuell anhand von progressiven Nierenerkrankungen, in deren Folge es zu Organfibrosen kommt, untersucht. Während der renalen Fibrogenese stammen rund 36% der aktivierten Fibroblasten aus lokaler EMT, der verbleibende Rest wird aus dem Knochenmark und lokaler Proliferation abgeleitet (Iwano et al. 2002). Auch für die Assoziation der EMT mit pulmonalen Fibrosen gibt es Beweise (Chilosi et

al. 2003). Dies macht die Relevanz der EMT für die Genese von Organfibrosen deutlich.

Epitheliale und mesenchymale Zellen repräsentieren zwei der Hauptzelltypen des Menschen. Epitheliale Zellen sind charakterisiert durch (I) kohäsive Interaktionen zwischen Zellen, die die Formation kontinuierlicher Zelllagen erleichtern; (II) die Existenz dreier Membrandomänen: apikal, lateral und basal; (III) die Anwesenheit von tight junctions zwischen apikalen und lateralen Domänen, (IV) die apikobasal polarisierte Anordnung verschiedener Organellen und Komponenten des Zytoskeletts; und (V) das Fehlen von Mobilität der einzelnen Epithelzelle im Hinblick auf ihre lokale Umgebung.

Multizelluläre mesenchymale Bauweise unterscheidet sich von multizellulärer epithelialer Bauweise durch: (I) das Auftreten von lockeren oder nicht vorhandenen

Interaktionen zwischen den Zellen, sodass keine kontinuierliche Zellschicht ausgebildet werden kann; (II) undeutliche laterale und apikale Membranen; (III) fehlende apikobasale Polarisation der Zellorganellen und Zytoskelettbestandteile; und (IV) freibewegliche Zellen, die auch invasive Eigenschaften besitzen können.

Während der Entwicklung können gewisse Zellen durch Vorgänge eines straff regulierten Prozesses, vom epithelialen zum mesenchymalen Status übergehen.

Dieser Prozess, der mit einer Vielzahl zellulärer und molekularer Ereignisse assoziiert ist, wird EMT genannt.

Ein kritisches molekulares Merkmal der EMT ist die Herunterregulation von E-Cadherin. Das Zelladhäsionsmolekül ist ein Calcium- abhängiges Transmembran- Glykoprotein, lokalisiert in der Plasmamembran der meisten Epithelzellen embryonaler und adulter Gewebe. Auch das vermehrte Auftreten der Mesenchym- spezifischen Proteine Vimentin und Desmoplakin (Grille et al. 2003) charakterisiert die EMT (Abb.2).

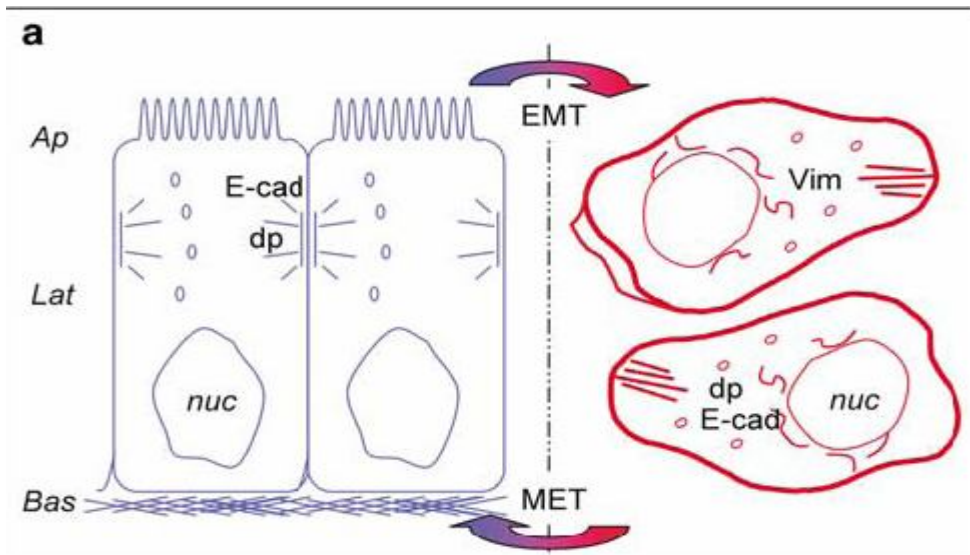


Abb. 2: zelluläre Modifikationen während der EMT(Schema) Quelle: Larue, Bellacosa 2005

Grundsätzlich ist die EMT reversibel und die Zellen können dem reziproken Mechanismus der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) (Abb.2) unterliegen.

Die EMT hat essenzielle Bedeutung für die Differenzierung von Geweben während der Embryogenese. Die Mechanismen der EMT treten in einem der frühesten Entwicklungsprozesse, bei der Entstehung des Mesoderms in der Phase der Gastrulation auf (Sanders und Prasad 1989). Darüber hinaus sind sie in späteren Stadien der Embryonalentwicklung an der Formation der Neuralleiste, an der Herzentwicklung und der Entstehung des Gaumens beteiligt (Larue und Bellacosa 2005).

Die epithelial-mesenchymale Phänotypänderung ist ein gemeinsames Phänomen der Embryonalentwicklung, der Wundheilung und der Tumormetastasierung. Die entstehenden Zellen zeigen gesteigerte Motilität und reduzierte interzelluläre Adhäsion.

Der Rückgriff auf die EMT während der Gewebeheilung ist Ausdruck partieller Redifferenzierung. Dieser Mechanismus ist im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes mellitus, bei Hypertonie und in bestrahlten Geweben beeinträchtigt (Toker 2000). Es treten Wundheilungsstörungen auf, deren Ursache in der Dysregulation der EMT zu suchen ist. Durch die veränderten extrazellulären Bedingungen wird ein Wandel der intrazellulären Transkriptionskontrolle des epithelialen Phänotyps,

über die Aktivierung verschiedener spezifischer Transkriptionsfaktoren, generiert (Savagner 2001).

Die TGFbeta- Superfamilie umfasst viele kleine multifunktionale Proteine, die zelluläres Wachstum, Migration und Differenzierung während der Embryogenese, wie auch postnatal kontrollieren (Massague 1998, Massague 2000, Whitman 1998).

So ist zum Beispiel TGFbeta3 ein essentieller Wachstumsfaktor für die Induktion der EMT während der embryonalen Gaumenentwicklung (Kang und Massague 2004, Kang und Svoboda 2005).

Als ein weiterer nachgeschalteter Effektor von TGFbeta wurde die PI3- Kinase in der TGFbeta vermittelten EMT identifiziert (Bakin et al. 2000, Metzner et al. 1996). Diese aktiviert über Phosphorylierung die PDK1, deren Ziel die PKC (protein kinase C) (Pullen et al. 1998) und die Proteinkinase B (AKT) (Burgering und Coffey 1995) sind.

Es wurde gezeigt, dass TGFbeta die Phosphorylation von Akt über die PI3K stimuliert (Bakin et al. 2000). Die daraus resultierenden molekularen Mechanismen, wie Reorganisation von Aktin- Fasern und Translokation von E- Cadherin, wurden begleitet von der Transition kubischer Zellen zu einer spindelförmigen Morphologie. Beide Ereignisse, auf zellulärer wie auf molekularer Ebene, konnten durch den PI3K- Inhibitor LY294002 und einen Kinase- inaktiven Akt- Mutanten inhibiert werden. Im Gegensatz dazu konnte durch Smad3- Hemmung kein gleichwertiger Effekt erzielt werden. Daraus resultiert die Erkenntnis, dass die TGFbeta- vermittelte EMT Smad- unabhängig ist (Bhowmick et al. 2001). Das widerspricht früheren Berichten, die dem Smad- Signalweg eine Rolle bei der Vermittlung der TGFbeta- induzierten EMT zusprachen (Piek et al. 1999).

Weiterhin scheint Rho A als PI3K/AKT- vorgeschaltete GTPase eine Rolle zu spielen (Bakin et al. 2000) (Abb.3).

Betrachtet man aber die verlangsamte Kinetik der Akt- Phosphorylierung (30min- 2h), besteht eine weitere Möglichkeit der Akt- Aktivierung. Nicht direkt vermittelt durch die Typ I-III TGFbeta- Rezeptoren, sondern womöglich durch die autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren der EGF- Familie mit konsequenter Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (Abb.3), wie es für Hepatocyten von Ratten gezeigt wurde (Murillo et al. 2005).

Im Tiermodell wurden auch andere Signalwege beschrieben, die zu EMT führen (Boyer et al. 2000)(Abb.3).

Verschiedene Wachstumsfaktoren (FGF, EGF, TGF alpha, IGF)sind in der Lage EMT zu induzieren, indem sie an Rezeptortyrosinkinasen binden (Gavrilovic et al. 1990, Morali et al. 2001).

Der intrazelluläre Signalweg wird von nachgeschalteten Effektoren aus der SRC- Familie und Ras bestritten (Boyer et al. 2000)(Abb.2).

Nachgeschaltete Effektoren dieses Weges sind Jun und Fos (Boyer et al. 1997), sowie PI3K selbst (Abb.3).

Trotz der sehr unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Situationen während der Embryogenese, Wundheilung oder Tumormetastasierung scheinen die letzten, den Phänotyp kontrollierenden Effektoren dieselben oder zumindest ähnlich zu sein.

Es gibt zunehmende Berichte, das Twist (Kang und Massague 2004), Snail (Cano et al. 2000, Ip und Gridley 2002, Ohkubo und Ozawa 2004)und Slug (Bastidas et al. 2004, Del Barrio und Nieto 2004) die Transkriptionsfaktoren sind, die die EMT kontrollieren. Dies geschieht auf dem Weg der Regulierung von Zelladhäsionsproteinen, obwohl die oberflächlichen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und deren nachfolgende Signaltransduktionswege den Transkriptionsfaktoren vorgeschaltet sind (Kang und Massague 2004).

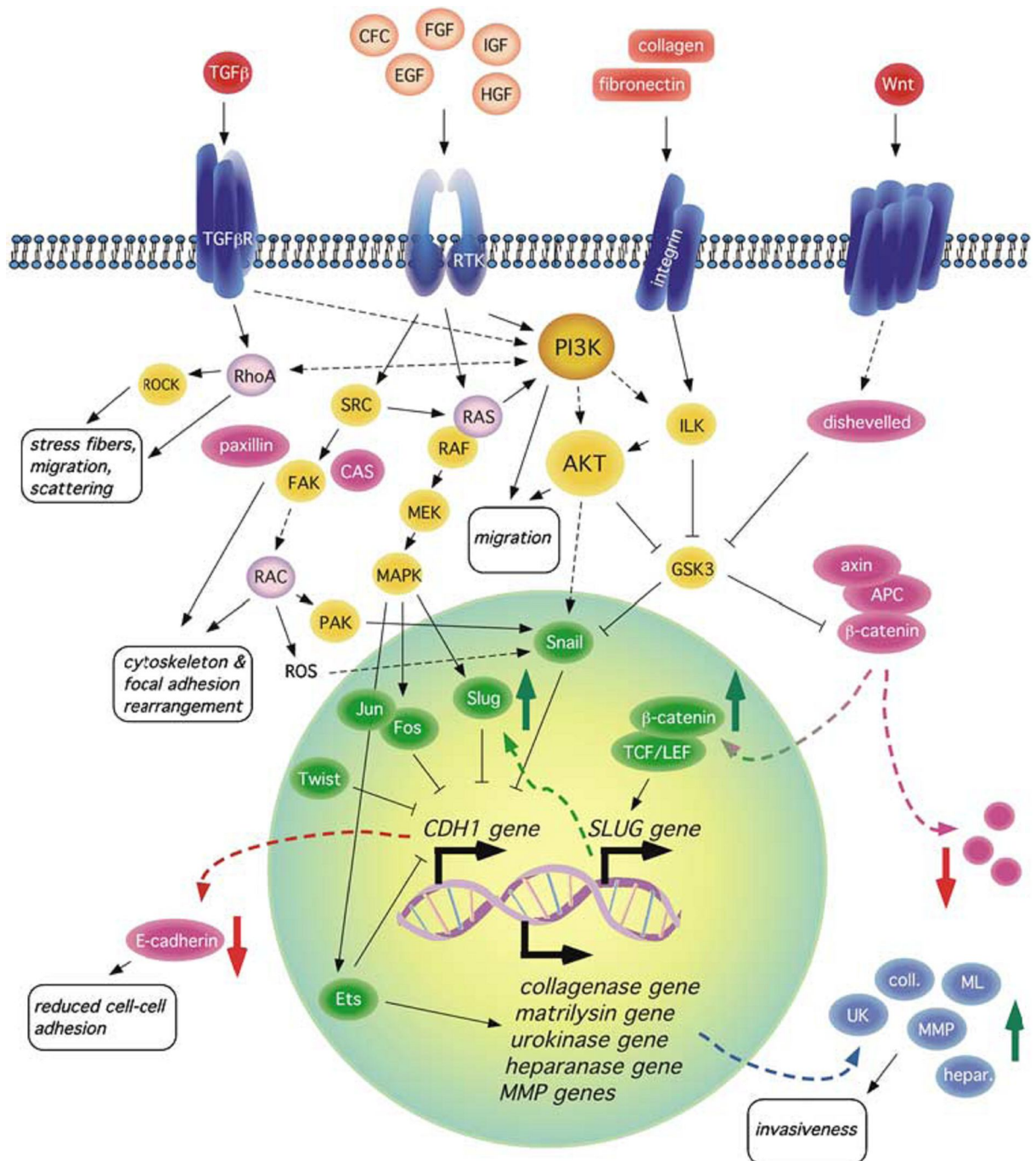


Abb. 3: Schema der EMT- assoziierten Signalwege

Quelle: Larue, Bellacosa 2005

Aus dem Vergleich der bekannten Signalwege lässt sich die dominante Rolle von TGFβ ableiten. Doch es wurde auch gezeigt, dass EMT TGFβ-unabhängig induziert werden kann.

Ein wichtiger Vermittler der EMT ist Akt. Als nachgeschalteter Effektor der PI3K im Zytoplasma beeinflusst Akt viele wichtige Prozesse in der Zelle.

2.2.3. Der PI3Kinase /Akt –Signalweg

Der PI3K/Akt -Weg ist einer der wichtigsten Signalwege, die das Zellwachstum regulieren (Vivanco und Sawyers 2002). Er vermittelt eine Vielzahl an Zellantworten auf extrazelluläre Stimulation durch Peptid-Wachstumsfaktoren und Hormone. PI3K/Akt beeinflusst das Überleben und den Zelltod zur gleichen Zeit, zusätzlich zu anderen grundlegenden Zellfunktionen wie dem Wachstum, der Motilität, der Differenzierung und der Insulin-Aktivität (Abb.4).

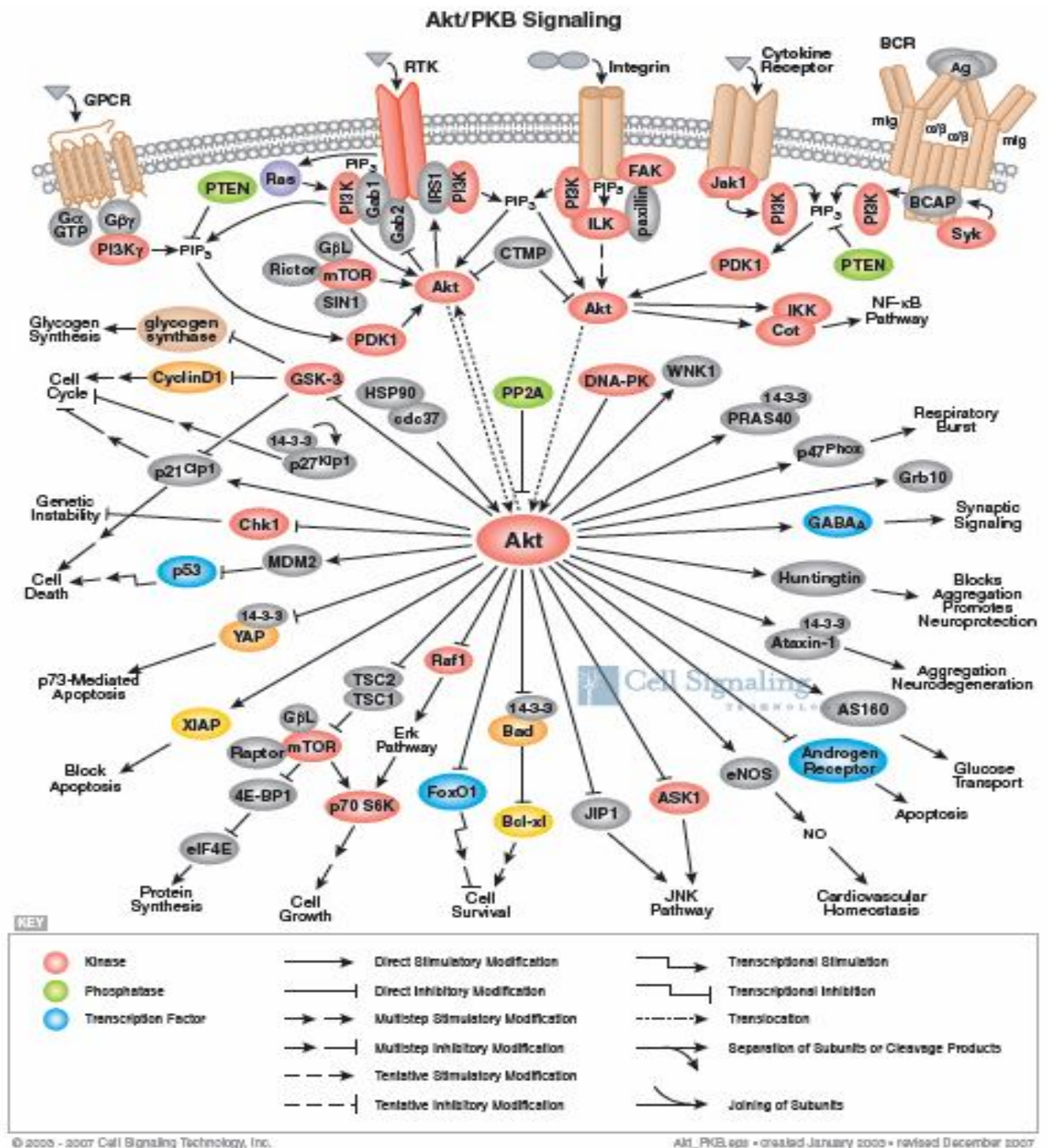


Abb.4: Akt- Signalwege

Quelle: Cell Signaling Technology, Inc

Die Dysregulation dieses Weges geht mit Krankheiten wie Krebs und Diabetes einher (Toker 2000).

Die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) befindet sich im Zytoplasma. Es existieren zwei Typen der PI3-Kinasen: Typ A und B. Sie bestehen jeweils aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit und unterscheiden

sich in der Art der Aktivierung. Typ A wird durch Rezeptor- Tyrosin- Kinasen aktiviert, indem das Adaptorprotein der regulatorischen Untereinheit Phosphotyrosine über die SH2-Domäne bindet (Myers und White 1993, Yamamoto et al. 1992). Typ B ist seltener und besitzt eine differente regulatorische Untereinheit und wird durch den $\beta\gamma$ -Komplex eines Ligand-aktivierten G-Proteins aktiviert. Die katalytische Untereinheit ist in beiden Fällen gleich. Sie besitzt eine Bindungsstelle für aktiviertes Ras. Darüber ist die direkte Stimulation durch Ras möglich.

Ist die PI3-Kinase aktiviert, so katalysiert sie die Phosphorylierung von Inositol- Phospholipiden an Position 3 des Inositolringes. Die entstehenden Lipide $PI(3, 4)P^2$ und $PI(3, 4, 5)P^3$ agieren als Andockstationen für intrazelluläre Signalproteine und bilden Signalkomplexe mit diesen. Auf diesem Weg wird ein Signal von der Zelloberfläche in deren Inneres übertragen.

Die Inaktivierung der Phospholipasen erfolgt durch spezifische Inositol-Phospholipid- Phosphatasen (PTEN).

Akt ist eine Schlüsselkomponente des PI3K/Akt-Signalweges (Franke et al. 1997).

Akt wird als nachgeschalteter Effektor der PI3K von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF, Insulin und TGFbeta aktiviert/beeinflusst.

Die Bindung PI3K-generierter Phospholipide an die PH-Domäne (Pleckstrin homology) von Akt resultiert in einer Konformitätsänderung und in der Translokation von Akt aus dem Zytoplasma an die lumenseitige Plasmamembran, wo es durch PDK1 phosphoryliert wird (Andjelkovic et al. 1996) (Abb.5).

Die Schlüsselmediatoren des PI3K/Akt-Signalweges stammen aus der ACG-Superfamilie der Serin/Threonin Proteinkinasen. Die meisten Mitglieder dieser Gruppe benötigen eine aktivierende Phosphorylierung. 1997 wurde die PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) entdeckt. Sie ist verantwortlich für die doppelte Phosphorylierung von Akt. Akt wird zum Einen an Thr308 (activation loop) und zum Anderen an seinem hydrophoben Carboxyl- Ende Ser473 phosphoryliert, wobei beide Phosphorylierungen Mitose- und PI3K- abhängig sind (Alessi et al. 1997, Stokoe et al. 1997). PDK-1 stellt in diesem Zusammenhang eine vorgeschaltete Kinase für Thr308 dar.

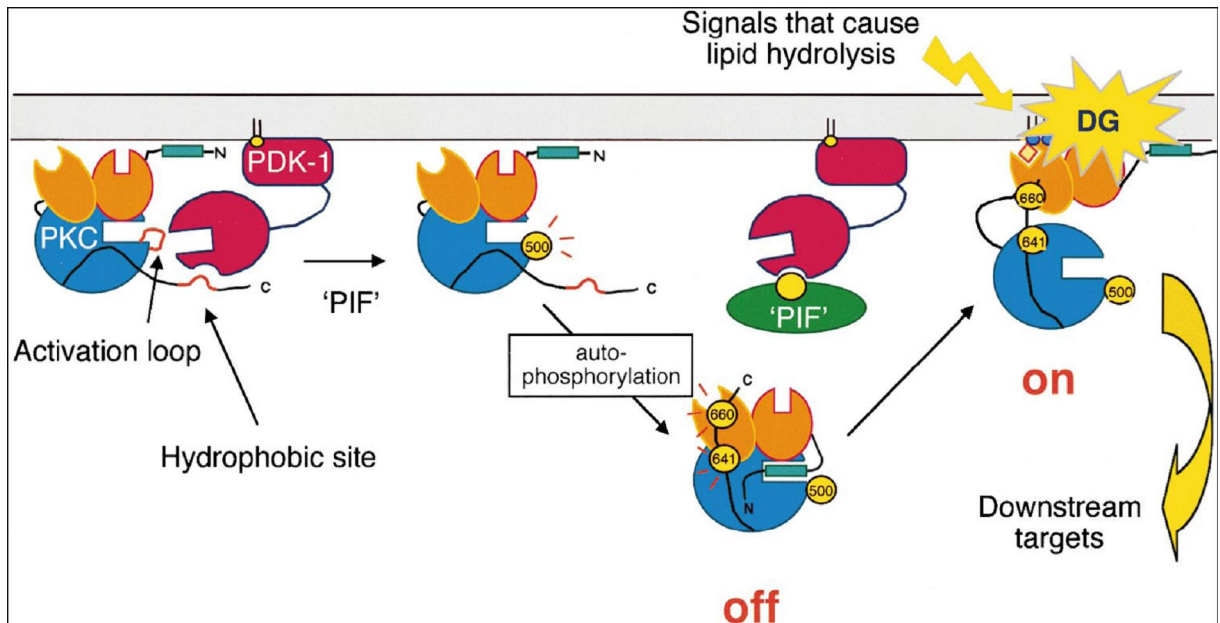


Abb. 5: Akt- Aktivierung
2000

Quelle: Toker et al.

2.2.4. Vorkommen und Funktion von Akt

Nach Aktivierung gelangt Akt zurück ins Zytoplasma, wo es eine Vielzahl von nachgeschalteten Substraten phosphoryliert, die in die Regulierung von Zellbewegung, Zellfortbestand und Zellwachstum involviert sind (Cantley 2002, Vivanco und Sawyers 2002).

Es kann die Transkription der Gene hemmen, die pro- apoptotische Proteine verschlüsseln.

Akt ist radioinduzierbar. Nach niedrig dosierter Radiatio hat die Phosphorylierung von Akt ihren Höhepunkt nach 6h. Es scheint als hätte die radio- induzierte Aktivierung von Raf und Akt protektive Wirkung gegen den Zelltod. Akt wirkt antiapoptotisch (Kim et al. 2007).

Der Beweis, dass Akt EMT induziert wurde in einer Studie mit Zellreihen aus Plattenepithelkarzinomen erbracht (Grille et al. 2003).

Die Akt- induzierte EMT beinhaltet den Verlust der interzellulären Adhäsion, Veränderungen in der Morphologie, den Verlust apiko- basolateraler Zellpolarisation, die Induktion der Zellmotilität, eine Verminderung der Zellmatrixadhäsion und Veränderungen der Produktion und Verteilung spezifischer Proteine. Akt induziert ebenso die Produktion von Metalloproteinasen und die Zellinvasion (Kim et al. 2001, Park et al. 2001).

Laut einer aktuellen Studie hat Akt doppelten profibrotischen Effekt. Es begünstigt die Kollagensynthese und lässt die Degradation über die Herunterregulation von MMP1 absinken. Bewiesen wurde dies durch die Blockade von Akt in Sklerodermie- Fibroblasten. Die Akt Blockade führte zur Inhibition von TypI Kollagen, zur Hochregulation der MMP1- Produktion und zur Umkehr des inhibitorischen Effektes von TGFbeta auf MMP1 (Bujor et al. 2008).

Es existieren drei Akt-Isoformen: Akt 1-3. Sie sind strukturell homolog und teilen den gleichen Aktivierungsmechanismus, aber sie weisen deutlich verschiedene Eigenschaften auf. Akt 1 und 2 werden ubiquitär exprimiert, während über Akt 3 berichtet wird, die Expression sei auf bestimmte Gewebe begrenzt (Yang et al. 2003). Aufkommende Beweise unterstützen die Anschauung, dass die Akt- Isoformen in normalen Zellen, wie auch in Tumorzellen verschiedene Funktionen inne haben.

Studien mit isoform- defizienten Mäusen unterstreichen die Funktionen von Akt 1 und 2. So sind Akt1^{-/-} Mäuse klein mit signifikanten Wachstumsdefekten, und Akt2^{-/-} Mäuse sind nicht in der Lage ihre Glukosehomöostase aufrecht zu erhalten (Cho et al. 2001).

Akt 2 kann auch im Zusammenhang mit dem Insulin- stimulierten Glukosemetabolismus genannt werden. Dies wurde in Studien mit Akt 2^{-/-} Mausembryofibroblasten belegt (Bae et al. 2003, Jiang et al. 2003).

Der Verlust oder die Herunterregulation von Akt 2 beeinträchtigt die Phosphorylierung der Glycogen-Synthase-Kinase 3α und die Translokation des Glukosetransporters 4 deutlicher als die Herunterregulation von Akt 1. Jedoch resultiert die kombinierte Herunterregulation von Akt 1 und 2 in schwerwiegenderen Defekten.

Weitere isoform- spezifische Funktionen von Akt wurden in einer Studie anhand von IGF-1R stimulierten Epithelzellen entdeckt. Während die Herunterregulation von Akt 2 alle erwarteten Aspekte einer IGF-1R- induzierten Phänotypveränderung aufwies, wurde bei einer spezifischen Herunterregulation von Akt1 eine dramatische Phänotypveränderung, ähnlich der EMT, und erhöhte wachstumsfaktor- induzierte Motilität gefunden. Diese Phänotypveränderungen sind mit einer Hochregulation des Signalweges ERK/MAPK assoziiert. Interessanterweise setzt die EMT- ähnliche

Morphologieveränderung, während Herunterregulation von Akt 1, die Expression von Akt 2 voraus. Diese isoform- spezifischen Effekte sind wahrscheinlich Kreuzregulationen mit anderen Signalwegen geschuldet (Irie et al. 2005).

2.2.5. EMT, Wundheilung und Fibrose

Bedingt durch präoperative Gewebeschädigung, durch Radiatio oder Stoffwechselerkrankungen, gerät die physiologische EMT während der Wundheilung außer Kontrolle. Es treten häufig fibrotische Veränderungen auf, die zu Wundheilungsstörungen führen oder eine Heilung unmöglich machen.

Der Hauptunterschied zwischen dem physiologischen Vorgang der Entwicklung und dem pathologischen Prozess ist, dass während der Entwicklung zelluläre und molekulare Ereignisse einem zeitlich und räumlich streng regulierten Plan unterliegen, die Transformation aber keiner Ordnung unterlegen ist.

Alle fibrotischen Funktionsstörungen haben einen persistierenden Reiz gemeinsam, der die Produktion von Wachstumsfaktoren, proteolytischer Enzyme, angiogenetischer Faktoren und fibrogenetische Zytokine unterhält. So wird die Deposition konnektiver Gewebeelemente stimuliert, die zum progressiven Umbau und zur Zerstörung der normalen Gewebearchitektur führt (Friedman 2004, Tomasek et al. 2002, Wynn 2007).

TGFbeta als gutuntersuchter Regulator der ECM- Synthese ist eng verknüpft mit der Entstehung einer Fibrose innerhalb vieler Erkrankungen (Border et al. 1992, Clouthier et al. 1997, Sato et al. 2003, Sime et al. 1997). Es existieren drei Isotypen von TGFbeta. TGFbeta 1, 2 und 3 sind biologisch ähnlich aktiv, aber die Gewebefibrose wird TGFbeta 1 zugeschrieben, dessen zelluläre Quelle zirkulierende Monocyten und Gewebemakrophagen sind. Einmal aktiviert signalisiert TGFbeta über Transmembranrezeptoren. Diese lösen die Aktivierung zwischengeschalteter Signalglieder, die als Smads bekannt sind, aus. Dieser Mechanismus moduliert die Transkription wichtiger Zielgene, wie Prokollagen I und III (Roberts et al. 2003).

Die Reduktion der radioinduzierten dermalen Fibrose (Flanders et al. 2002) in Smad3- defizienten Mäusen belegt die wichtige Rolle des TGFbeta-Signalweges in diesem Zusammenhang.

Der bisherige therapeutische Ansatz wurde durch exogene Antagonisierung von TGFbeta beziehungsweise der nachgeschalteten Smad- Proteine geprägt. In der Wundheilung, besonders nach Bestrahlung konnte die angestrebte antifibrotische Wirkung nicht erzielt werden. Die Ursachensuche ergab, das TGFbeta nicht der alleinige Promotor von EMT und Fibrose ist. Akt, auch nachgeschalteter Effektor von TGFbeta im Rahmen der EMT, übernimmt selbst eine wichtige Schlüsselrolle. Wie gezeigt wurde, existieren multiple Einflussmöglichkeiten auf Akt. Diese alternativen Aktivierungswege existieren trotz Antagonisierung von TGFbeta weiter und könnten für die Fibroprogression verantwortlich sein.

Darüber hinaus ist Akt radioinduzierbar. Nach niedrig dosierter Radiatio hat die Phosphorylierung von Akt ihren Höhepunkt nach 6h. Es scheint als hätte die radio-induzierte Aktivierung von Raf und Akt protektive Wirkung gegen den Zelltod. Akt wirkt antiapoptotisch (Kim et al. 2007).

Fibrose tritt auf, wenn die Neusynthese von Kollagen durch Myofibroblasten, die Abbaurate übersteigt und somit der Gesamtumfang an kollagenen Fasern über die Zeit ansteigt.

Myofibroblasten sind wiederum der zelluläre Schlüsselmediator der Fibrose, da sie als primäre Kollagen- produzierende Zellen agieren (Kumar 2005). Aktuell wird beschrieben das Myofibroblasten aus multiplen Quellen stammen (Quan et al., 2006). Zusätzlich zu residenten Mesenchymzellen, leiten sich Myofibroblasten von Knochenmarksstammzellen ab (Bucala et al. 1994). Darüber hinaus stammen Myofibroblasten von Epithelzellen ab, die den Prozess der Epithelial- Mesenchymalen Transition durchlaufen (Quan et al., 2006; Willis et al. 2006, Zeisberg et al. 2007). Diese bereits bekannten Tatsachen lassen auf ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Einflussfaktoren schließen und ordnen die Wundheilung in ein Netzwerk zellulärer und molekularer Mechanismen ein.

TGFbeta und Akt scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation von EMT und Wundheilung einzunehmen. Beide Faktoren werden jedoch durch neoadjuvante Radiatio beeinflusst und in ihrer physiologischen Funktion

beeinträchtigt. In der Folge entstehen fibrotische Wundheilungsstörungen, die den Therapieerfolg minimieren.

Nun soll untersucht werden, ob bei gezielter Beeinflussung von TGFbeta während der Wundheilung auch der eben nicht ausschließlich TGFbeta-nachgeschaltete Effektor Akt im Einflussbereich dieses Therapieansatzes liegt.

3. Ziele der Arbeit- Fragestellung

1 Etablierung der Methode zum Nachweis von phosphoryliertem Akt

Im Rahmen der Dissertation soll im vorliegenden Material p- Akt nachgewiesen werden. Akt ist nur im phosphorylierten Zustand aktiv. Deshalb ist es unerlässlich phosphoryliertes Akt nachzuweisen. Die verfügbaren Antikörper für phospho- Akt sind aber für immunhistochemische Untersuchungen nicht geeignet. Somit ist die semiquantitative Bestimmung von Akt mittels Westernblot die einzige Nachweismöglichkeit.

2 Vergleichende, semiquantitative Bestimmung von aktiviertem Akt

in bestrahltem und unbestrahltem Gewebe mittels Westernblot zur Evaluierung neuer antifibrotischer Therapieprinzipien zur Optimierung der Einheilung freier Transplantate im vorbestrahlten Lager

3 Liegt Akt im Einflussbereich des Therapieansatzes der Antagonisierung von TGFbeta?

4. Material und Methoden

4.1. Tiermodell

Bei Wistar-Ratten (220-350g) wurde 4 Wochen nach präoperativer Bestrahlung der Halsregion mit 40 Gy (16 Tiere), und ohne Vorbestrahlung (16 Tiere) ein freier myokutaner Gracilislappen von der Leiste in den Halsbereich verpflanzt. Bei 16 Tieren wurde eine Bestrahlung mit 4 x 10 Gy vorgenommen und damit ein ersatzschwaches Lager erzeugt. Bei 8 bestrahlten Tieren erfolgte vom 1.-7. Tag nach Transplantation die Applikation von anti-TGF- β_1 in das übergangsnähe Transplantatlager.

Durch spindelförmige Exzision wurde das Probenmaterial am 0., 3., 14. und 28. postoperativen Tag gewonnen.

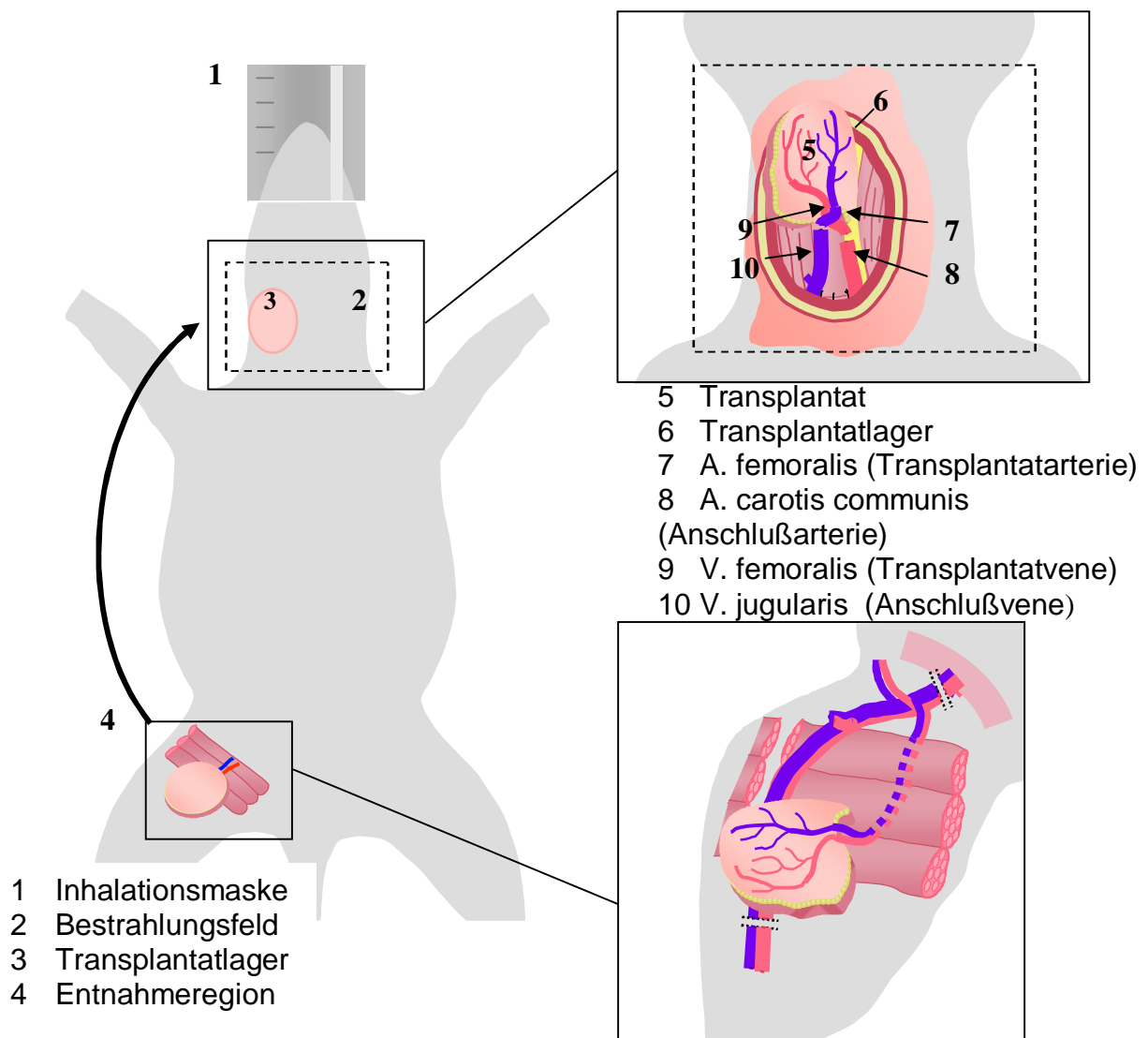


Abb.6: Entnahme und Verpflanzung des freien myokutanen Gracilislappens von der rechten Leiste in den Halsbereich

Bei Dissertationsbeginn lag das zu untersuchende Material, schockgefroren und bei -80°C asserviert, vor. Da die geplante proteinchemische Nachweisreaktion nicht denaturiertes Protein voraussetzt, wurde die Kühlkette ohne Unterbrechung bis unmittelbar vor die Lyse strikt eingehalten.

4.2. Etablierung der Nachweismethode

Im Rahmen der Dissertation soll im vorliegenden Material p- Akt nachgewiesen werden. Wie beschrieben ist Akt im Zytoplasma von Zellen multipler Gewebe zu finden. Doch die Anwesenheit von Akt lässt keine Aussage über dessen Aktivierungsgrad zu. Akt ist nur im phosphorylierten Zustand aktiv. Deshalb ist es unerlässlich phosphoryliertes Akt nachzuweisen. Aufgrund der Fragilität von p-Akt ist äußerste Präzision bei der Aufarbeitung der Proben erforderlich, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden und den Erhalt der aktivierten Form zu garantieren.

Ein spezifischer Antikörper zur Detektion ist erforderlich.

Entsprechend den Voraussetzungen der Arbeitsgemeinschaft und der Nichtverfügbarkeit eines Antikörpers für immunhistochemische Untersuchungen, ist die semiquantitative Bestimmung von Akt mittels Westernblot die einzige Nachweismöglichkeit.

4.3. Immunoblot- Analyse

Zur semiquantitativen Expressionsanalyse von phospho- Akt wurde die Methode des konventionellen Immuno- Blots (Western- Blot) angewendet (Towbin et al. 1979). Dabei lassen sich Proteine unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht auftrennen.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des lysierten Proteingemisches erfolgte die Nachweisreaktion über spezifische Primärantikörperbindung. Nach Bindung eines antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörpers erfolgt die Detektion mit einem speziesspezifischen, markierten Antikörper. Dieser Sekundärantikörper bindet an den konstanten Teil des an das Protein gebundenen Primärantikörpers. Die Visualisierung der spezifischen Proteinbindung erfolgte dann durch an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzyme, Chemolumineszenzfarbstoffe oder auch radioaktive Marker.

Es stehen verschiedene Verstärkersysteme zur Verfügung.

ABC- Methode

In diesem Fall erfolgte der Nachweis mit Hilfe der Avidin- Biotin- Peroxidase-Komplex-(ABCPOX)- Methode (Lloyd et al. 1985). Hierbei wird die Affinität von Biotin zu Avidin genutzt. Nachdem die Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das nachzuweisende Epitop erfolgt ist, wird ein biotinmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt, der spezifisch für die Bindung an den Primärantikörper ist. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex.

Ein Molekül Avidin kann drei Moleküle Biotin binden und steht somit zur Bindung sowohl der biotinmarkierten Sekundärantikörper als auch der biotinmarkierten Meerettichperoxidasemoleküle zur Verfügung. Es kommt zur Komplexbildung mit Konzentration mehrerer Peroxidase-moleküle am Sekundärantikörper (Abb.7)

In der chromogenen Nachweisreaktion wird an der durch den Sekundärantikörper markierten Stelle ein Farbsubstrat enzymatisch (Meerettichperoxidase) umgesetzt. Durch die Lokalisation der Farbreaktion wird das gesuchte Antigen repräsentiert.

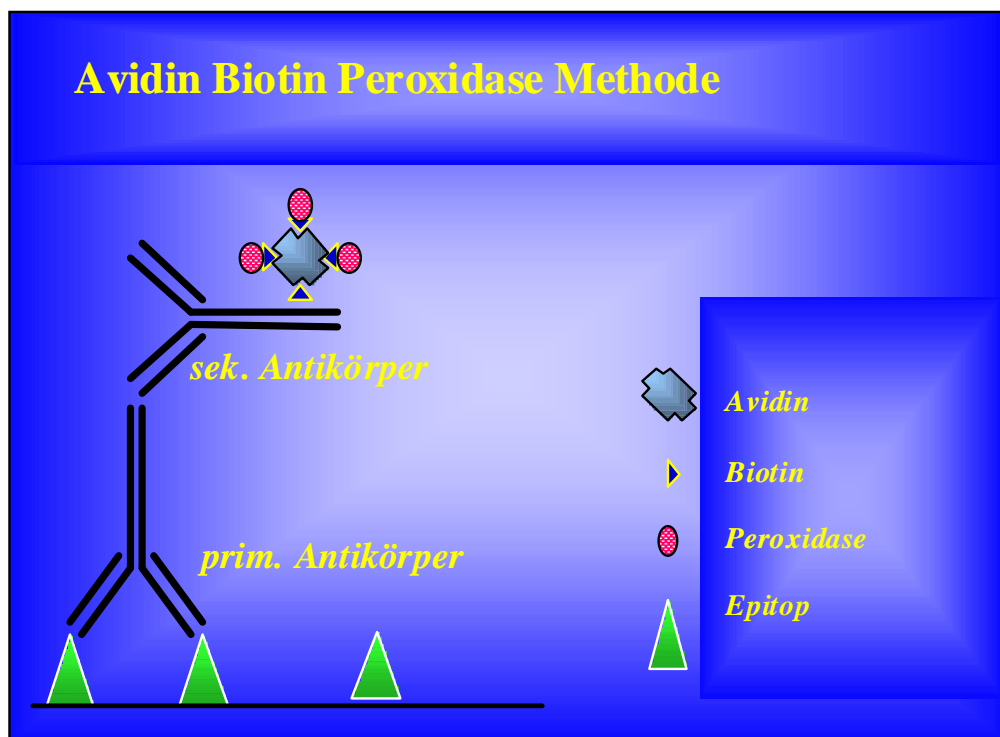


Abb.7 : Schemazeichnung der Avidin- Biotin- Meerettichperoxidase- Methode

Detektiert wurde mit einem konventionellen Chemolumineszenz-Nachweissystem.

Zur quantitativen Vergleichbarkeit der Zytokin- Expression wurde von jeder Probe die gleiche Proteinmenge eingesetzt und dieses durch α -Tubulin-Expressionsnachweis bei jedem Blot (housekeeping- Gene) als normalisierte Proteinratio (Schultze-Mosgau et al. 2006) verifiziert.

Immunoblot- Protokoll

Die geplanten proteinchemischen Nachweisreaktionen setzen nicht denaturiertes Protein voraus, daher wurden die diesbezüglich vorgesehenen Proben bis unmittelbar vor die Lyse strikt bei -80°C ohne Unterbrechung der Kühlkette asserviert.

Von jeder Gewebeprobe wurden am Cryostaten (CH 30505, Leica, Deutschland) circa fünfzig 20 μ m Gewebeschnitte, in Abhängigkeit von der Größe des vorhandenen Gewebes, angefertigt. Diese wurden anschließend in je 100 μ l Lysepuffer (1000 μ l 5xLyse-Puffer-Stock, Fa. Roth; 200 μ l 25x Protease- Inhibitor- Complete- Stock, Fa. Roche; 50 μ l 1mM PMSF, Fa.Roche; 25 μ l 1mM Na-Orthovanadat; 125 μ l 5mM NaF; 3600 μ l Aqua bidest.) gegeben. Nach einem 15-minütigen Ultraschallbad (ULTRASONIK, NDI) erfolgt die weitere Proteindissoziation 40 Minuten in Eiswasser. Anschließend werden die lysierten Gewebeproben für 5 Minuten bei 13000U/min zentrifugiert.

Die Protein-Konzentrationen wurden anschließend im Protein- Assay bestimmt (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Das lysierte Protein wurde jeweils zu 15 μ g je Kammer in der Gelelektrophorese eingesetzt (4-12% Polyacrylamid-Gel, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und aufgetrennt, wobei jede Gewebeprobe mit je 6,25l Ladepuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer 4x, Invitrogen) und 2,5l Reducing Agents (NuPAGE Sample Reducing Agent 10x, Invitrogen) versetzt wurde. Parallel zu den Proben wurde ein vorgefärbter Molekularmassenmarker (See Blue Prestained Standard 1x, Invitrogen) aufgetragen. Nach Befüllen der Elektrophorese- Kammer (Novex Mini Cell, Invitrogen) mit Laufpuffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer 20x, Invitrogen) erfolgte der Gel- Lauf bei 200Volt in 35 Minuten. Es schließt sich der Elektroblot bei 30 Volt auf eine Transfermembran (Nitrozellulose-Membran,

Invitrogen) an. Die Membran wird anschließend in Blockierlösung 30 min inkubiert (TBS: 5% Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20, Merck). Es folgt die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper (Phospho-Akt(Thr308)(244F9)Rabbit mAb, Cell Signaling Technology) mit einer Verdünnung von 1:1000 in oben genannter Blockierlösung 12 h bei 4°C unter kontinuierlicher Bewegung.

Es folgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Polyclonal Goat Anti- Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated, Dako, Dänemark) wiederum in einer Konzentration von 1:1000 für eine Stunde. Nach 30 minütiger Inkubation mit AB-Komplex/ Meerettichperoxidase (ABComplex/HRP, Dako, Dänemark) wurde die Farbreaktion mit dem Chemolumineszenzsystem ECL (ECL, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) entwickelt.

Als Ladekontrolle zur Bestätigung gleicher Proteinkonzentrationen in jedem Blot und um die quantitative Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten, wurde α -Tubulin unter Verwendung der in Tabelle 1 und 2 genannten Antikörper jeweils bestimmt und detektiert.

Tab. 1 Verwendete Primärantikörper

Verwendete Primärantikörper			
gesuchtes Protein	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Phospho- Akt	Kaninchen anti- Ratte Phospho Akt	1:1000	Cell Signaling
α -Tubulin	Ratte anti- Ratte α - Tubulin	1:1000	Serotec

Tab. 2: Verwendete Sekundärantikörper

Verwendete Sekundärantikörper				
gesuchtes Protein	Spezies	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Phospho- Akt	Ziege	Anti- Kaninchen-IgG biotinyliert	1:500	Dako
α -Tubulin	Kaninchen	Anti-Ratte IgG:HRP	1:500	AbD Serotec

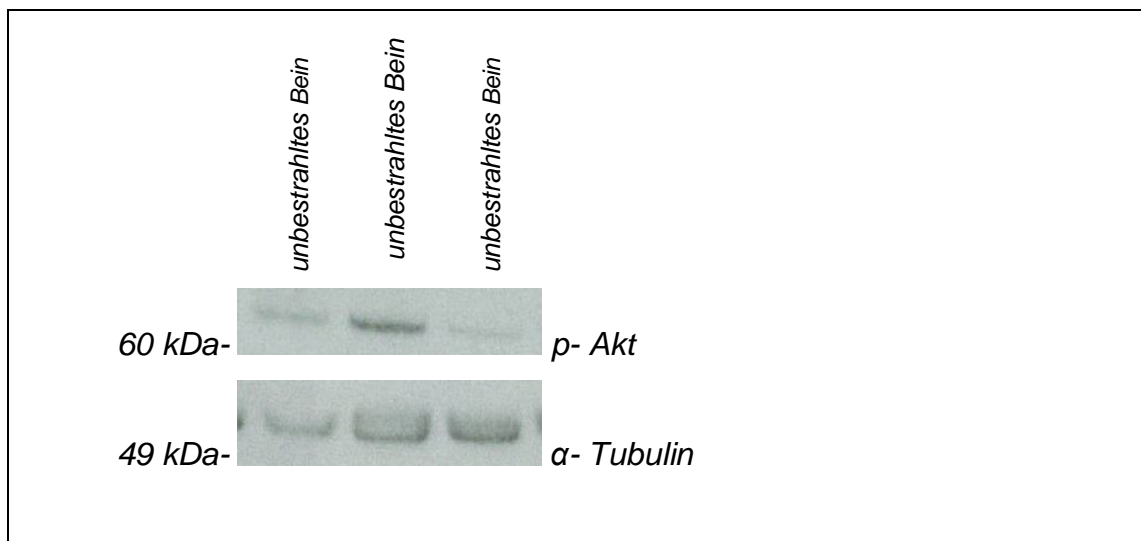
5. Ergebnisse

5.1. Semiquantitative Immunoblot- Analyse

5.1.1. Expression phospho- Akt

Die quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist durch die normalisierte Proteinratio, bezogen auf α - Tubulin, gewährleistet. Sie zeigt die gleiche Proteinbeladung bei allen durchgeführten Messungen und damit die gleiche Gesamtproteinmenge.

In den unbestrahlten Gewebeproben ist am 0. Tag keine Beeinträchtigung der phospho- Akt Expression festzustellen.



*Abb.8: p-Akt- Expression 0. Tag, unbestrahltes Bein
Normalisierte Proteinratio α - Tubulin*

Die vorbestrahlten Proben zeigen eine signifikant erhöhte Expression von phospho- Akt.

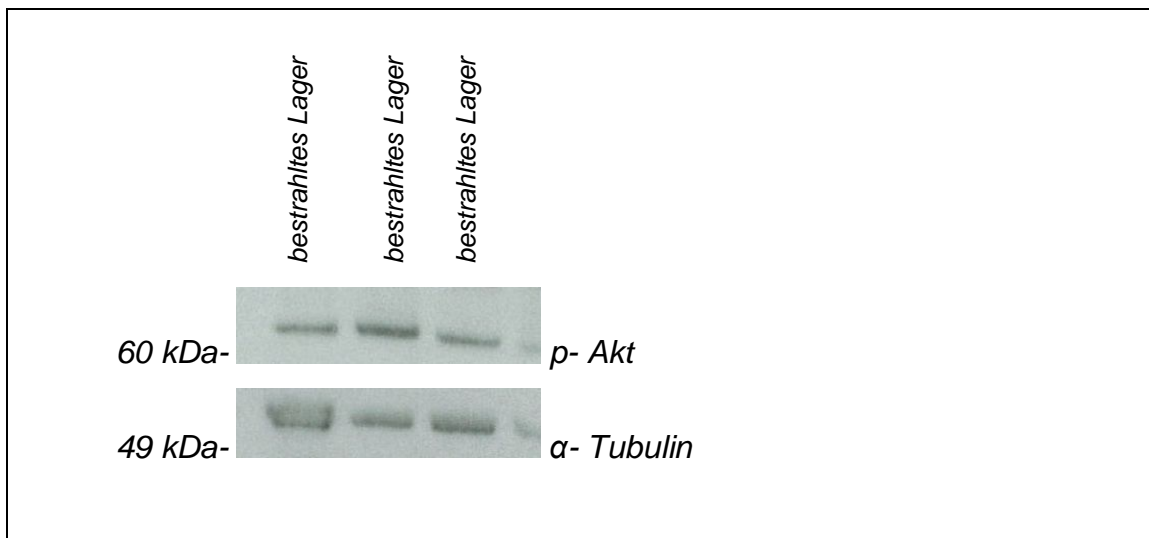


Abb. 9: *p-Akt- Expression 0. Tag, bestrahltes Lager*
Normalisierte Proteinratio α- Tubulin

Am 3. postoperativen Tag kann bei den präoperativ bestrahlten Proben eine im Vergleich zum 0.Tag unverändert hohe Expression von p- Akt detektiert werden.

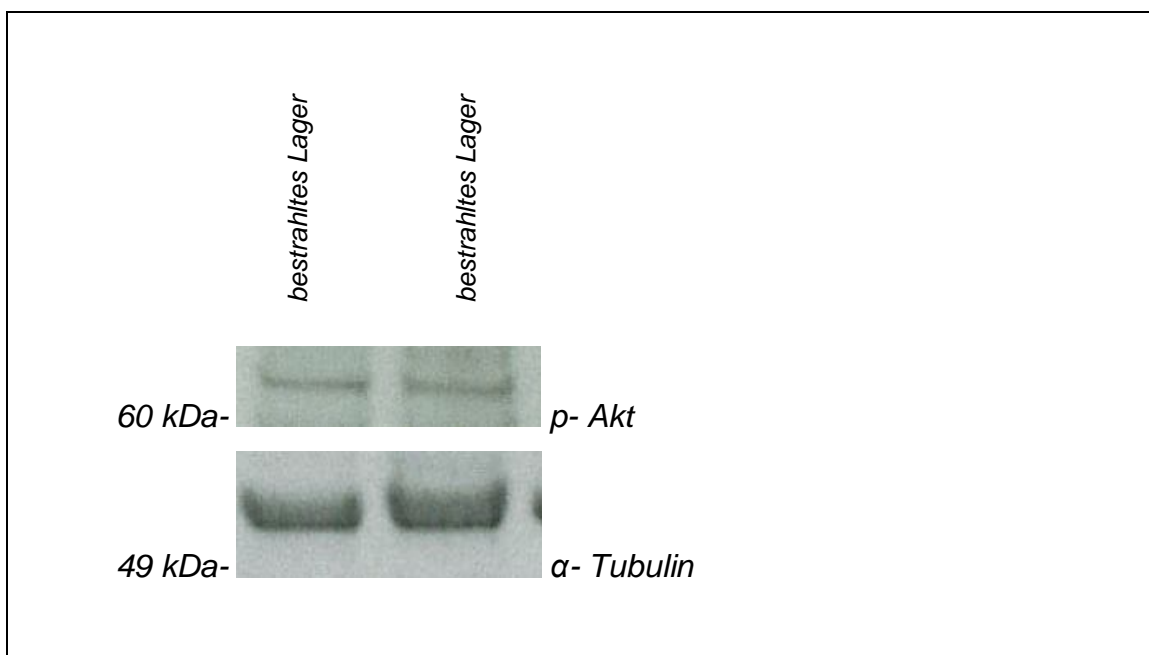


Abb. 10: *p-Akt- Expression 3. Tag, bestrahltes Lager*
Normalisierte Proteinratio α- Tubulin

Die durch anti- TGFbeta behandelten Proben zeigen keinen Expressionsunterschied für phospho- Akt am 3. postoperativen Tag, im Vergleich zu den Unbehandelten.

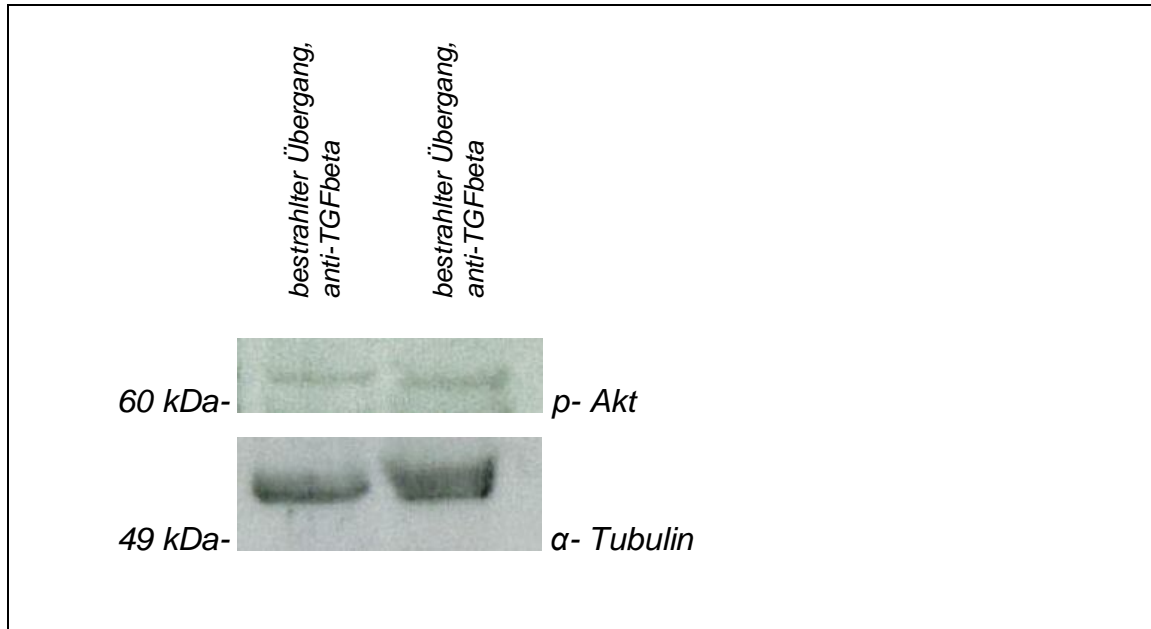


Abb. 11: p-Akt- Expression 3. Tag, bestrahlter Übergang, anti- TGFbeta
Normalisierte Proteinratio α- Tubulin

Am 14. postoperativen Tag ist zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Proben zu unterscheiden.

In der unbestrahlten Probe vom Bein ist keine phospho- Akt Expression mehr zu verzeichnen.

Dahingegen ist die p- Akt Expression in den bestrahlten Proben von Hals und Lager unverändert hoch.

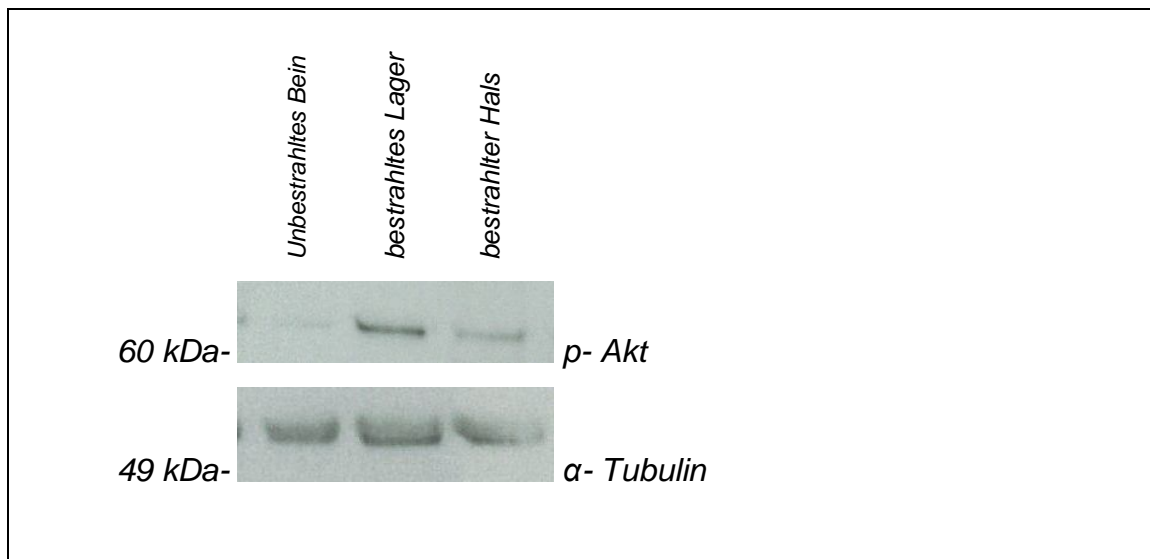


Abb. 12: p-Akt- Expression 14. Tag, unbestrahltes Bein, bestrahltes Lager, bestrahlter Hals

Normalisierte Proteinratio α- Tubulin

Am 28. postoperativen Tag ist die bestrahlte Probe im Zeitverlauf zu betrachten. Auch hier wird p- Akt immer noch exprimiert. Und auch hier hat anti- TGFbeta keinen Einfluss auf die Expression von p- Akt.

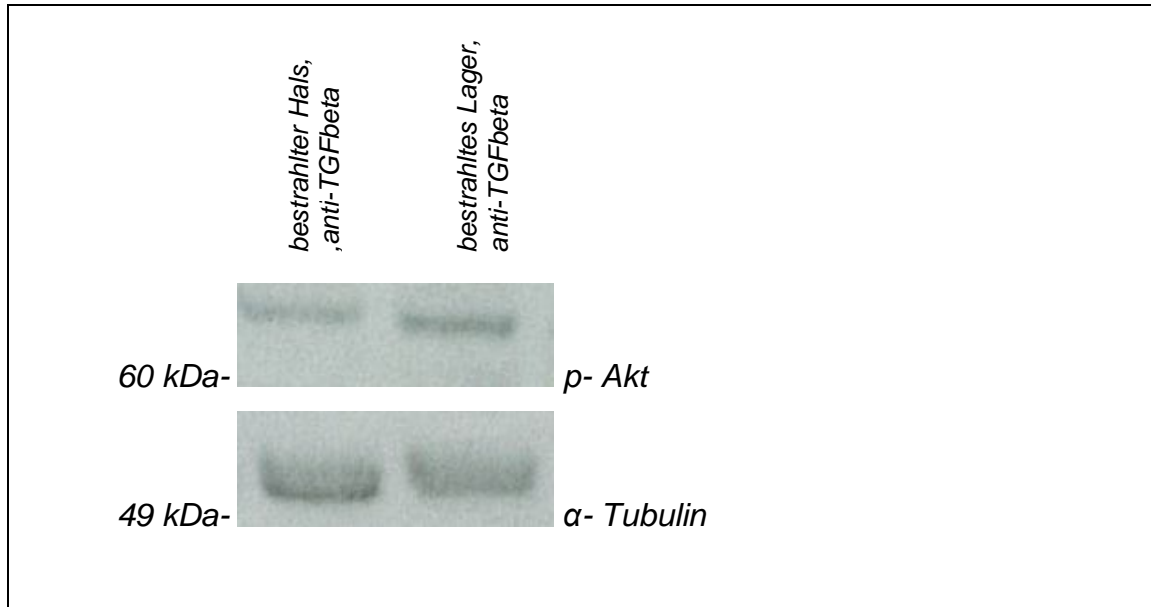


Abb. 13: p-Akt- Expression 28. Tag, bestrahlter Hals, bestrahltes Lager, anti-TGFbeta
Normalisierte Proteinratio α- Tubulin

6. Diskussion

6.1. Diskussion Tiermodell

Die Verfügbarkeit einer breiten Palette polyklonaler Antikörper zur Detektion von Zytokinen und ECM- Komponenten erweist sich als Vorteil der Verwendung des Tiemodells der Ratte. Darüber hinaus stellt die Ratte ein etabliertes Modell für die Untersuchung der Einheilung von Weichgewebetransplantaten in unbestrahltem und bestrahltem Gewebe dar (Kostakoglu et al. 1997).

Ausgangspunkt für die eigenen Arbeiten war das von Schultze-Mosgau et al. etablierte Lappenmodell und die daran durchgeführten Untersuchungen zur Vaskularisation im bestrahlten Transplantatlager (Schultze-Mosgau et al. 2001). Die Arbeiten von Karl und Tilgner zeigten eine Vergleichbarkeit der Einheilungsvorgänge von freien Transplantaten bei Ratte und Mensch (Karl et al. 1978, Tilgner et al. 1989). Biologische und strukturelle Veränderungen von Haut und intestinalen Organen nach experimenteller Bestrahlung von Ratten sind durch Untersuchungen belegt (Aitasalo et al. 1992, Hauer-Jensen et al. 1988). Etabliert sind dabei Gesamtreferenzdosen bei Nagetieren von 30-50 Gy (Stmad et al. 1996, 1997). Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit eingesetzte Gesamtreferenzdosis von 30 Gy bei der Ratte ist nach TDF-Modell (time- dose- fractionation) einer klinischen Gesamtreferenzdosis von 58,21 Gy äquivalent, bzw. 68,51 Gy nach dem LQ- Modell (Linearquadratisches Modell).

Bei der Interpretation der experimentellen Ergebnisse sollte beachtet werden, dass die Stoffwechselrate der Ratte im Vergleich zum Menschen um den Faktor 4- 6 erhöht ist. Folglich ist die Übertragbarkeit der experimentellen Ergebnisse insbesondere hinsichtlich der zeitlichen Korrelation von Bestrahlung, folgender Weichgewebetransplantation und der auftretenden biologischen Gewebeveränderungen eingeschränkt.

6.2. Diskussion Methode

Akt als Transkriptionsfaktor muß in der aktivierten, also phosphorylierten Form nachgewiesen werden, da die Anwesenheit von Akt allein keinen Aufschluss über dessen Aktivierungszustand liefert. Die verfügbaren Antikörper für

phospho- Akt sind aber nicht für immunhistochemische Untersuchungen geeignet, die bereits in der Arbeitsgruppe etabliert sind. Der immunhistochemische Nachweis wurde bisher von nur einer Arbeitsgruppe beschrieben (Richter et al. 2005). Der Nachweis kann nicht nachvollzogen werden, da der verwendete Antikörper nicht mehr verfügbar ist. Somit ist die semiquantitative Bestimmung von Akt mittels Westernblot die einzige Nachweismöglichkeit. Die Etablierung der Methode war Gegenstand der Arbeit.

6.3. Diskussion Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Radioinduzierte vermehrte Expression von p- Akt induziert. Die schon bekannte Radioinduzierbarkeit der Akt- Aktivierung und damit verbundener Phosphorylierung (Kim et al. 2007) konnte anhand der eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Die Antagonisierung von TGFbeta scheint keinen Einfluß auf die p- Akt- Expression am 3. postoperativen Tag zu haben, obwohl bereits bekannt ist, dass anti- TGFbeta, die in die Signalkaskade von TGFbeta involvierten Smad- Proteine am 3. Tag hemmt (Schultze-Mosgau et al. 2006). Anti- TGFbeta wird eingesetzt, um die, die Heilung negativ beeinträchtigende Fibrose zu mindern beziehungsweise zu eliminieren.

TGFbeta induziert die epithelial- mesenchymale Transition (Derynck und Zhang 2003, Miettinen et al. 1994, Okada et al. 1997). Dieser Mechanismus liegt der Fibrose zugrunde, da während des Prozesses fibroverantwortliche Myofibroblasten (Wynn 2008) generiert werden (Kalluri und Neilson 2003). Der angewandte Therapieansatz ist nicht erfolgreich. Die fibrotische Entartung des Gewebes wurde aufrechterhalten. Bekannt ist, dass Fibrose auch TGFbeta- unabhängig möglich ist (Ma et al. 2003). Hier wird Akt eine Rolle zugesprochen, da es nicht durch die Modulation der Smad- Proteine beeinflussbar ist, wie in den eigenen Untersuchungen gezeigt wurde. Des Weiteren ist Akt ein potenter Stimulator der EMT (Grille et al. 2003), die auch für die Entstehung kollagen- produzierender Myofibroblasten verantwortlich ist. Myofibroblasten sind die zellulären Schlüsselmediatoren der Fibrose. Deshalb kann vermutet werden, dass Akt die Fibrosierung vorbestrahlter Wundareale,

trotz Antagonisierung von TGFbeta, unterhält. Hinzu kommt die ohnehin erhöhte Expression von p- akt nach Bestrahlung (Tan et al. 2006).

TGFbeta ist ein zentraler Mediator der Kollagendeposition und ein Hauptakteur der Fibrose. Es gibt Beweise das PI3K/AKT zum einen TGFbeta nachgeschaltet aktiviert werden kann. Zum anderen wurde auch eine direkte Interaktion von TGFbeta-Rezeptorkomplex und PI3K gezeigt (Wilkes et al. 2005, Yi et al. 2005). Darüberhinaus hat eine Studie gezeigt das in Fibroblasten die PI3K- Aktivierung in Reaktion auf TGFbeta die Smad2/3- Phosphorylierung, nukleäre Translokation und Transkriptionsaktivität nicht beeinflusst (Wilkes et al. 2005). Durch die Untersuchungen von Bujor et al. 2008 wurde bestätigt, das in humanen dermalen Fibroblasten die Smad2/3- Aktivierung durch Inhibierung von Akt nicht beeinflusst wird. Obwohl in vorangegangenen Studien berichtet wurde, das PI3K in die TGFbeta- Regulation der Kollagen- Gen- Expression involviert ist, wurde in oben genannter Studie bewiesen, das die Blockade von Akt der TGFbeta- Kollagen- Induktion nicht vorbeugen konnte. Dabei ist nahe liegend, dass die TGFbeta- Effekte bezüglich Kollagenproduktion durch Aktivierung verschiedener PI3K- Effektoren übermittelt werden. Während die Blockade der Komponenten des PI3K- Netzwerkes zum Rückgang der Kollagendeposition durch Fibroblasten führt, sind wieder verschiedene zelluläre Mechanismen in die Übertragung dieses Effekts involviert.

Zum nächsten Untersuchungszeitpunkt, dem 14. postoperativen Tag, sind wieder signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben zu erkennen. Die Gewebeproben der unbestrahlten Donorregion zeigen keine dauerhafte Expression von p- Akt. Dies kann mit dem Ablauf der normalen Wundheilung erklärt werden.

Im bestrahlten Lager dagegen ist die Expression unverändert hoch. Dies ist auch zu diesem Zeitpunkt noch mit der Radioinduktion der Akt- Expression zu erklären.

Doch auch an dieser Stelle der Probenentnahme befindet sich die Wundheilung im gleichen Stadium, wie im unbestrahlten Gewebe. Die Remodellingphase ist dafür zuständig, das instabile Granulationsgewebe in stabiles Kollagen umzuwandeln, das der späteren Narbe ausreichend

Festigkeit gibt, den entstandenen Defekt adäquat zu decken. Für die Entstehung von Kollagen sind Fibroblasten verantwortlich, die in dieser Phase der Wundheilung physiologisch der EMT unterliegen.

In den vorbestrahlten Regionen wird die Wundheilung aber durch die Anwesenheit von Akt gestört. Die EMT entgleist. Akt wirkt zeitgleich als Promotor der EMT (Grille et al. 2003) und fördert dadurch die Entstehung von Myofibroblasten, andererseits wirkt es antiapoptotisch (Kim et al. 2007). Dieses Zusammenspiel führt zur pathologischen Vermehrung von Bindegewebe im Wundareal. Kennzeichnend ist die exzessive Deposition von extrazellulären Matrixkomponenten, Kollagen eingeschlossen. Während des Vorgangs verhärtet sich das Gewebe des betroffenen Organs und es entstehen narbige Veränderungen. Im fortgeschrittenen Stadium kann die Fibrosierung zur Einschränkung der Funktionalität führen. Da die durch Akt hervorgerufene Fibrose eine Folge der präoperativen Bestrahlung ist, spricht man von Strahlenfibrose.

Beim Vergleich der Gewebeproben vom 28. Tag kann man feststellen, dass Akt in den bestrahlten Proben weiterhin exprimiert wird. Auch hier ist keine Expressionsminderung durch anti- TGFbeta- Behandlung festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass anti- TGFbeta nicht in der Lage ist die Akt-Expression zu reduzieren.

Anti- TGFbeta scheint partiell wirksam zu sein, aber eine Fibrosierung kann nicht verhindert werden. Sie wird durch radioinduziertes Akt unterhalten.

7. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von phospho- Akt unter den Bedingungen der physiologischen Wundheilung, der durch präoperative Bestrahlung und präoperative Bestrahlung und anti- TGFbeta- Behandlung modifizierten Wundheilung betrachtet. Es ist ersichtlich, dass p- Akt unter physiologischen Bedingungen, abhängig von den Wundheilungsstadien exprimiert wird. Es hat Anteil an der EMT, die in der Remodelling- Phase auftritt, um Granulationgewebe in eine stabile Narbe zu transformieren.

Die postulierte Expressionsinduktion von p- Akt konnte anhand des eigenen Probenmaterials bewiesen werden.

Die Antagonisierung von TGFbeta zur Fibrosereduktion hatte keinen Einfluss auf die Expression von Akt. Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung von Akt nicht zwingend TGFbeta –abhängig ist.

Akt liegt unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit nicht im Einflussbereich dieses Therapieansatzes. Möglicherweise ist eine Antagonisierung von Akt ein effektiveres Mittel zur antifibrotischen Therapie im vorbestrahlten Gewebe und stellt eine Alternative für zukünftige Behandlungsmethoden dar.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aitasalo K, Relander M, Virolainen E. 1997. The success rate of free flaps after preoperative irradiation in head and neck reconstruction. *Ann Chir Gynaecol*, 86 (4):311-317.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol*, 7 (4):261-269.
- Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (21) 15000-5704.
- Antonakopoulos GN, Hicks RM, Hamilton E, Berry RJ. 1982. Early and Late Morphological-Changes (Including Carcinoma of the Urothelium) Induced by Irradiation of the Rat Urinary-Bladder. *British Journal of Cancer*, 46 (3):403-416.
- Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ. 2003. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*, 278 (49):49530-49536.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 275 (47):36803-36810.
- Bastidas F, De Calisto J, Mayor R. 2004. Identification of neural crest competence territory: role of Wnt signaling. *Dev Dyn*, 229 (1):109-117.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. 2001. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 12 (1):27-36.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1992. Natural inhibitor of transforming growth factor-

- beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*, 360 (6402):361-364.
- Boyer B, Valles AM, Edme N. 2000. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol*, 60 (8):1091-1099.
- Boyer B, Roche S, Denoyelle M, Thiery JP. 1997. Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *Embo J*, 16 (19):5904-5913.
- Bucala R, Vlassara H, Cerami A. 1994. Advanced Glycosylation Endproducts - Role in Diabetic and Nondiabetic Vascular-Disease. *Drug Development Research*, 32 (2):77-89.
- Bujor AM, Pannu J, Bu S, Smith EA, Muise-Helmericks RC, Trojanowska M. 2008. Akt Blockade Downregulates Collagen and Upregulates MMP1 in Human Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol*,
- Burgering BM, Coffey PJ. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376 (6520) 599-602.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2 (2):76-83.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296 (5566) 55-1657.
- Chilosi M, Poletti V, Zamo A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. 2003. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 162 (12) 1499-1502.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. 2001. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 276 (42):38349-38352.
- Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. 1997. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest*, 100 (11):2697-2713.

- Del Barrio MG, Nieto MA. 2004. Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo. *Dev Dyn*, 229 (4) 129-139.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425 (6958):577-584.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB. 2002. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol*, 160 (3):1057-1068.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88 (4):435-437.
- Friedman SL. 2004. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 1 (2) 99-105.
- Gavrilovic J, Moens G, Thiery JP, Jouanneau J. 1990. Expression of transfected transforming growth factor alpha induces a motile fibroblast-like phenotype with extracellular matrix-degrading potential in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Regul*, 1 (13):1003-1014.
- Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN, Larue L. 2003. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 63 (9) 2169-2178.
- Herskind C, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M, Bamberg M, Rodemann HP. 1998. Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 47 (3):263-269.
- Illsley MC, Peacock JH, McNulty RJ, Yarnold JR. 2000. Increased collagen production in fibroblasts cultured from irradiated skin and effect of TGF beta(1) - clinical study. *British Journal of Cancer*, 83 (5):650-654.
- Ip YT, Gridley T. 2002. Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways. *Curr Opin Genet Dev*, 12 (4):423-429.
- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS. 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in

- regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 171 (6):1023-1034.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 110 (3):341-350.
- Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP. 2003. Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (13):7569-7574.
- Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 112 (12):1776-1784.
- Kang P, Svoboda KKH. 2005. Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. *Journal of Dental Research*, 84 (8):678-690.
- Kang Y, Massague J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118 (3):277-279.
- Kim CS, Kim JK, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS, Kim CS, Jin YW, Kim J. 2007. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt. *Mol Cells*, 24 (3):424-430.
- Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. 2001. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *Faseb J*, 15 (11):1953-1962.
- Kostakoglu N, Manek S, Green CJ. 1997. The development of neovascularisation in flap perfabrication with vascular implantation: an experimental study. *Br J Plast Surg*, 50 (6):428-434.
- Kumar RK. 2005. Morphological methods for assessment of fibrosis. *Methods Mol Med*, 117:179-188.
- Langberg CW, Hauerjensen M, Sung CC, Kane CJM. 1994. Expression of Fibrogenic Cytokines in Rat Small-Intestine after Fractionated-Irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 32 (1):29-36.
- Larue L, Bellacosa A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24 (50):7443-7454.

- Lloyd RV, Schmidt K, Blaivas L, McCoy JP, Wilson BS. 1985. A Rapid Immunostaining Method Utilizing Preformed Antibody-Avidin-Biotin-Peroxidase Complexes. *American Journal of Clinical Pathology*, 83 (4) 630-639.
- Ma LJ, Yang H, Gaspert A, Carlesso G, Barty MM, Davidson JM, Sheppard D, Fogo AB. 2003. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6^{-/-} mice. *Journal of Cell Biology* 161 (2) 1267-1273.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791.
- Massague J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (2) 163-178.
- Metzner B, Barbisch M, Bachmann F, Czech W, Norgauer J. 1996. Evidence of the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in the migration, actin stress fiber formation, and alpha v beta 3-integrin-mediated adherence of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 107 (4) 598-602.
- Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 2):2021-2036.
- Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP, Larue L. 2001. IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene*, 20 (36):4942-4950.
- Murillo MM, del Castillo G, Sanchez A, Fernandez M, Fabregat I. 2005. Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF-beta1 in hepatocytes. *Oncogene*, 24 (28):4580-4587.
- Myers MG, Jr., White MF. 1993. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes*, 42 (4) 643-650.
- Ohkubo T, Ozawa M. 2004. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*, 117 (Pt 9):1675-1685.

- Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. 1997. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol*, 273 Pt 2:F563-574.
- Park BK, Zeng X, Glazer RI. 2001. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 61:7647-7653.
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. 1999. TGF- β type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci*, 112 Pt 24:4557-4568.
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*, 279:707-710.
- Richter P, Bohmer FD, Hindermann W, Borsi L, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Kosmehl H, Berndt A. 2005. Analysis of activated EGFR signalling pathways and their relation to laminin-5 gamma 2 chain expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Histochemistry and Cell Biology*, 124:151-160.
- Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. 2003. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci*, 995:1-10.
- Sanders EJ, Prasad S. 1989. Evidence that plasminogen activator is not involved in basement membrane penetration at avian gastrulation. *Exp Cell Res*, 185:394-398.
- Sato N, Sanjuan IM, Heke M, Uchida M, Naef F, Brivanlou AH. 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol*, 260:404-413.
- Savagner P. 2001. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*, 23:919-923.
- Schultze-Mosgau S, Kopp J, Thorwarth M, Rodel F, Melnychenko I, Grabenbauer GG, Amann K, Wehrhan F. 2006. Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I α 1 and α 2 by antitransforming growth factor-beta1 treatment

- during radiation-impaired wound healing. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 64 (1):280-288.
- Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest*, 100 (4):770-776.
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, 277 (5325):567-570.
- Tan J, Geng L, Yazlovitskaya EM, Hallahan DE. 2006. Protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in irradiated vascular endothelium. *Cancer Res*, 66 (4):2320-2327.
- Toker A. 2000. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol*, 57 (4):652-658.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (5):349-363.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9):4350-4354.
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2 (7):489-501.
- Whitman M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev*, 12 (16):2445-2462.
- Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Dore JJ, Suzuki K, Edens M, Sharma DK, Pagano RE, Leof EB. 2005. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Research*, 65 (22):10431-10440.
- Willis BC, duBois RM, Borok Z. 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*, 3 (4):377-382.

- Wynn T. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214 (2): 200-210.
- Wynn TA. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, 117 (3):524-529.
- Yamamoto K, Lapetina EG, Moxham CP. 1992. Insulin like growth factor-I induces limited association of phosphatidylinositol 3-kinase to its receptor. *Endocrinology*, 130 (3):1490-1498.
- Yang KY, Arcaroli J, Kupfner J, Pitts TM, Park JS, Strassheim D, Perng RP, Abraham E. 2003. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase gamma in neutrophil apoptosis. *Cell Signal*, 15 (2):225-233.
- Yi JY, Shin I, Arteaga CL. 2005. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 280 (11):10870-10876.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 67 (21):10123-10128.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. S. Schultze- Mosgau für die Betreuung des Dissertationsprojektes.

Meinem Tutor Dr. Dr. F. Wehrhan gilt mein besonderer Dank, da das Gelingen dieses Projektes ohne seine Hilfe kaum möglich gewesen wäre.

Ein Dankeschön gilt auch meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums emotional begleitet und finanziell unterstützt hat.

St. Hörtzsch danke ich für seine Geduld und dafür, dass er mich immer wieder zum Festhalten an meinen Zielen bestärkt hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau, Dr. Dr. F. Wehrhan, Dr. Dr. M. Thorwarth, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30. Juni 2008

Susanne Pinkert